

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—141401

⑤ Int. Cl.³
C 08 B 37/00

識別記号

庁内整理番号
6580—4C

④ 公開 昭和57年(1982)9月1日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑬ 分子量分布幅を狭めたプルランの製造方法

⑭ 発明者 吉田幹彦

岡山市一宮15番地の5

① 特 願 昭56—156134

⑮ 出 願 人 株式会社林原生物化学研究所

② 出 願 昭55(1980)10月15日

岡山市下石井1丁目2番3号

③ 特 願 昭55—142953の分割

明 細 書

1 発明の名称

分子量分布幅を狭めたプルランの製造方法

2 特許請求の範囲

原料プルランを部分分解した後、分画し、重量平均分子量/数平均分子量が15以下の画分を採取することを特徴とする分子量分子幅を狭めたプルランの製造方法。

3 発明の詳細な説明

プルランは、オーレオバンディウム・プルランス (*Aureobasidium pullulans*) を単糖類、少糖類などの糖類を含む栄養培地に好氣的に培養して得られるグルカンであって、その化学構造は、主としてマルトトリオースが繰り返して—1,6—グルコシド結合した線状高分子である。

プルランは、工業的に分子量 80000～800000 程度のものが製造、販売され、プルランの持っている水溶性、可食性、接着性、造膜性などの優れた性質が食品工業、化学工業などに広く利用されている。

本発明者は、プルランの用途をさらに拡大するために、市販の各種重量平均分子量 (以下、 \bar{M}_w と示す) のプルランについて、ゲル濾過法により重量平均分子量/数平均分子量 (以下、 \bar{M}_w/\bar{M}_n と示す) を調べたところ、何れも20以上と分子量分布幅の広いものであることが判明した。

そこで、本発明者は、分子量分布幅を狭めた高純度プルランの製造方法、なかでも \bar{M}_w/\bar{M}_n が15以下のプルランの製造方法について鋭意研究した。

その結果、原料プルランを部分分解すればそれに含まれる高分子量のプルランが低分子量のプルランよりも容易に加水分解を受け、次いで有機溶媒などで分画すれば、目的のプルラン画分が高収率で採取しうることを見だし本発明を完成した。

本発明でいう原料プルランとしては、部分分解した後、 \bar{M}_w/\bar{M}_n が15以下であるプルランが採取し得るものであればよく、一般には \bar{M}_w が目的のプルランのそれよりも大きいものが適している。

部分分解の条件としては、原料プルランが部分的に加水分解を受けて目的のプルラン画分が増量す

ればよい。その手段としては、例えばブルラン水溶液を、乳酸、クエン酸、塩酸、硫酸などの有機、無機酸類、或はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)、 α -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)、ブルナーゼ(EC 3.2.1.41)、イソブルナーゼ(EC 3.2.1.57)、イソアミラーゼ(EC 3.2.1.68)などの酵素類、超音波などで処理する方法が適宜採用される。工業的には、大量処理の容易な酸または酵素による部分分解法が適している。

このようにして部分分解したものから、目的ブルラン画分を得る方法としては、通常メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトンなどの親水性有機溶媒による分画法が用いられるが、必要に応じて、例えばゲル濾過法、膜分離法などを用いることができる。

得られたブルラン画分は、通常、活性炭、イオン交換樹脂などによって脱色、脱塩して精製して目的のブルラン製品にする。この際、必要ならば、メンブランフィルターにて濾過し、濃縮して無色

透明なシラップ状、またはさらに乾燥、粉末化して白色粉末状のバイロゲン無含有のブルラン製品にする。

このようにして得られたブルランは、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が15以下と分子量分布幅を狭めた高純度で水溶性の線状高分子であるので、水溶性高分子標準試薬として有利に利用される。例えば、ゲル濾過法や液体クロマトグラフィーに利用される場合には、通常、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が18~21程度に分子量分布幅を狭めたブルランが好適である。この際、 \overline{M}_n を、例えば20000、30000、40000、50000、60000などのように各種取りそろえて水溶性高分子標準試薬のキットを製造し利用することも好都合である。

また、本発明のブルランは、血漿増量用、血流改善剤などにも好適である。通常、 \overline{M}_w が80000~90000のブルランを固形物当り約4~10% (w/v)の水溶液にし、これに塩類、糖類などの等張化剤を加え、滅菌して血漿増量用または血流改善用注射製剤を製造すればよい。

以下、実験に基づいて詳細に説明する。

第 2 表

手 段	未分解	部 分 分 解	
		酸	酵 素
ブルラン収率(%)	16	48	55

実験 1 分子量分布幅を狭めたブルランの製造

$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が25であり \overline{M}_w が150000の原料ブルランを10% (w/v)の水溶液とし、(A)未分解のまま、(B)硫酸酸性下(pH約2)で80℃に2時間保って部分分解した後中和し、また(C)酵素剤(α -アミラーゼ剤、長瀬産業株式会社製造、商品名「ネオスピターゼ」)をブルラングラム当り糊精化力活性で550単位の割合で加えてpH5.5、温度80℃で20時間保って部分分解した後酵素を加熱失活させ、次いで、これら(A)(B)(C)を80℃に保ちつつ、それぞれにメタノールを48% (v/v)になるように加え生じた下層部を除去した後、得られた上層部にさらにメタノールを60% (v/v)になるように加えて静置した後、下層部を分画採取して乾燥粉末化し、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が14である \overline{M}_w 60000のブルラン製品を得た。

本製品の原料ブルランに対する収率(固形物換算)は、第1表にまとめた。

第2表の結果から明らかなように、原料ブルランをそのまま分画採取するよりも、部分分解した後目的ブルランを分画採取する方が高収率である。

この原因を検討するために、部分分解ブルランを経時的にサンプリングし、ゲル濾過法により分子量分布の変化を調べたところ、酸、酵素何れの場合においても、原料ブルラン中の高分子ブルランの方が、低分子ブルランよりも加水分解作用を受け易い性質を有していることが判明した。このことから、部分分解の程度を目的ブルラン画分が最大になるように適宜選択することによって約40~60%、またはそれ以上の高収率を得ることも容易になった。

また、酸で部分分解するよりも、酵素で部分分解する方がやや高収率であった。

実験2 種々の $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 値を有するブルランの静脈注射

\overline{M}_w が80000で $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 値が28, 20, 15, 12である4種類のブルランを、生理食塩水に8% (w/v)に溶解し、滅菌して静脈注射実験用の血漿増量剤とした。

これらの血漿増量剤100 mlを体重約80kgの家兎に対し、約15分間で急速に静脈注射し、静脈注射時の静脈圧変化と、注入ブルランの排泄率を測定した。

静脈圧変化は、静脈注射開始前の静脈圧(mmHg)と静脈注射終了時の静脈圧とを測定し、静脈注射終了時静脈圧の静脈注射開始前静脈圧に対する上昇倍数を求め、静脈注射時の循環系に対する負荷の指標とした。

また、静脈注射開始後2時間以内に尿中に排泄されたブルラン量を測定し、静脈注射ブルラン量に対する排泄率(%)を求め、その体内保持程度から血漿増量効果の指標とした。

実験の結果を第2表に示した。なお、示した数値は家兎2羽づつの平均値である。

これらの結果から、分子量15000以下のブルランの場合には、静脈注射後尿への排泄までの半減期が極めて短時間であり、これでは腎臓への負荷を高めるのみで、血漿増量剤としての効果がほとんど期待できない。また、分子量150000以上のブルランの場合には、急速な静脈注射により静脈圧をかなり上昇させることが認められたことから循環系への負荷を高めることが懸念される。

従って、血漿増量剤には、本発明者等が先に昭和54年特許願第68976号で提案したブルランの \overline{M}_w が単に80000~90000であると言うだけでなく、分子量15000以下の低分子画分と、分子量150000以上の高分子画分とをできるだけ減少させて分子量分布幅を狭めた $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が15以下のブルランが好適である。

以下、2~8の実施例を述べる。

実施例 1

$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が28であり \overline{M}_w が80000である原料ブルラン200gを10% (w/v)水溶液にし、塩酸を

第 2 表

$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	28	20	15	12
静脈圧(倍)	21	17	18	12
排泄率(%)	45	82	17	13
評 価	劣	やや劣	優	優
	対 照	対 照	本発明	本発明

第2表の結果から明らかなように、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が15以下のブルランは、静脈注射時の静脈圧の上昇も少なく、また注入ブルランの急激な尿中排泄も少なく血漿増量用に好適である。

次に、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が28であり \overline{M}_w が80000のブルランをゲル透過法にて分画し、分子量15000以下のブルランと、分子量150000以上のブルランを採取し、前記と同様に家兎を使って実験したところ、分子量15000以下のブルランの場合は、静脈圧が約12倍であったが、尿中排泄率が約80%にも達し、逆に分子量150000以上のブルランの場合は、尿中排泄率が約7%であったが、静脈圧が約8倍にも達することが判明した。

用いてpHを約2にし、80℃に2時間保ってブルランの部分分解を行った後、カセイソーダで中和し、冷却して80℃に保ち、これにメタノールを40% (v/v)となるように加え、生じた下層部を除去した後、得られた上層部にさらにメタノールを55%となるように加えて静置した後、下層部を分別採取した。これからメタノールを留去し、残ったブルラン水溶液に活性炭を加えて脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂にて脱塩し、さらにメンブランフィルターにてろ過し、得た精製ブルランを濃縮、乾燥、粉碎して、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が14であり \overline{M}_w が80000であるブルランの白色粉末約90gを得た。

実施例 2

$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が26であり \overline{M}_w が80000である原料ブルラン200gを20% (w/v)の水溶液とし、硫酸を用いてpHを約2とし、80℃に2時間保ってブルランの部分分解を行った後、カセイソーダで中和し、40℃に保ちつつこれにエタノールを50% (v/v)となるように加え、生じた下層部を除

去した後、得られた上層部にさらにエタノールを70% (v/v) となるように加え、生じた下層部を採取した。

これをさらに、実施例1と同様に処理して精製し、 $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.8であり \overline{Mw} が80000であるブルランの白色粉末約70gを得た。

実施例 8

$\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が21であり \overline{Mw} が200000である原料ブルラン200gを5% (w/v) 水溶液となし、実施例1と同様に部分的分解した後、中和し、80℃に保ちつつ、これにアセトンを20% (v/v) となるように加え、生じた下層部を除去した後、得られた上層部にさらにアセトンを45% (v/v) となるように加え、生じた下層部を採取し、さらに実施例1と同様に処理して精製し、 $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.5であり \overline{Mw} が85000であるブルランの白色粉末約80gを得た。

実施例 4

$\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が2.8であり \overline{Mw} が800000である原料ブルラン200gを10% (w/v) 水溶液とし、これに、

同様に $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.1で \overline{Mw} 20000を有するブルランの白色粉末を約80g得た。

実施例 6

$\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が21であり \overline{Mw} が200000である原料ブルラン200gを5% (w/v) 水溶液にし、市販の α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1) (長瀬産業株式会社製造、商品名 ネオスピターゼ) をブルラングラム当り糊精化力で500単位の割合で添加し、pH 6.4、温度55℃に24時間保ってブルランの部分分解を行った後、酵素を加熱失活させ、次いで実施例8と同様にアセトンにて分画し、精製、濃縮、乾燥して実施例8と同じ $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.5で \overline{Mw} 85000を有するブルランの白色粉末を約110gを得た。

実施例 7

$\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が2.8であり \overline{Mw} 200000である原料ブルラン200gを10% (w/v) 水溶液とし、これに市販インアミラーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) をブルラングラム当り200単位の割合で添加し、pH 4.8、温度50℃に20時間保って

昭和58年特許出願公告第27791号公報で開示されているバチルス属細菌が生産したシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.19) をブルラングラム当り糊精化力で150単位の割合で添加し、pH 6.0、温度55℃に20時間保ってブルランの部分分解を行った後、90℃に15分間保って酵素を加熱失活させ、次いで、実施例1と同様にメタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、実施例1と同じ $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.4で \overline{Mw} 50000を有するブルランの白色粉末を約105gを得た。

実施例 5

$\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が2.6であり \overline{Mw} が80000である原料ブルラン200gを20% (w/v) の水溶液とし、これに、市販ブルナーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) をブルラングラム当り4単位の割合で添加し、pH 6.0、温度50℃に80時間保ってブルランの部分分解を行った後、酵素を加熱失活させ、次いで実施例2と同様にエタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、~~実施例2と~~

ブルランの部分分解を行った後、酵素を加熱失活させ、次いで実施例1と同様にメタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、~~実施例1と同~~様に $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.2で \overline{Mw} 40000を有するブルランの白色粉末を約90g得た。

実施例 8

$\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が21であり \overline{Mw} 580000である原料ブルラン200gを0.05M NaCl水溶液で10% (w/v) とし、これを80℃に保ちつつ、出力50W、45KHzの超音波発生器 (商品名 Branson ultrasonic cleaner, Model 12, ヤマト科学株式会社製、東京) で80分間処理し、次いで実施例1と同様にメタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、実施例1と同じ $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ が1.4で \overline{Mw} 50000を有するブルランの白色粉末を約70g得た。

特許出願人

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原



特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 56. 年特許願第 156134 号 (特開昭
57-141401 号 昭和 57 年 9 月 1 日
発行 公開特許公報 57-1415 号掲載) につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ
たので下記のとおり掲載する。 3 (3)

Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号
C08B 37/00		7133-4C

手 続 補 正 書

昭和59年7月23日

特許庁長官 志 賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第156134号

2. 発明の名称

分子量分布幅を狭めたプルランの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

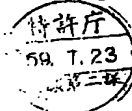
株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原



4. 補正の対象

明細書における「発明の詳細な説明」の項



方式



5. 補正の内容

- (1) 明細書第4頁第10行記載の「この際、 \bar{M}_n を、」
を「この際、 \bar{M}_w を、」に補正します。
- (2) 明細書第10頁第10行記載の「さらにメンブラ
ンフィルターにて」を「さらにメンブランフイ
ルターにて」に補正します。
- (3) 明細書第11頁第10行記載の「部分的分解した
後、」を「部分分解した後、」に補正します。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.